

大腸菌の形質転換→プラスミド抽出 ---English follows Japanese---

2021.6.1 updated (eng. ver was added) by AM

2024.4.16 updated by AM

Day1: 大腸菌のプラスミド DNA による形質転換 (夕方以降)

【準備するもの】

- ケミカルコンピテントセル
- プラスミド DNA or ライゲーション産物
- 抗生物質入りのアガープレート
- SOC 培地 or LB 培地
- ビーズ (ColiRoller™ plating beads) or コンラージ棒

- 1) ヒートブロックを 42 °C に温めておく。
- 2) -80 °C (Deep freezer) からコンピテントセル (10 µL~100 µL) の入ったチューブを取り出し、氷上で溶かす。※10 µL 程度ならフリーザーから出してすぐ氷上に置いてもすぐ溶ける。100 µL とかある時は、ちょっと室温に出しておいて、完全に溶けきらないうちに氷上に置くとよい。
- 3) コンピテントセルが溶けたら DNA を加え、氷上で 30 分間静置。※コンピテントセル溶液の容量が大きい場合 (50 µL≤) は、ものすごく優しく、数回ピペッティングで細胞と DNA を混ぜた方がよい (逆に 10 µL だったら混ぜなくてもよい)。環状プラスミド DNA を Transform する場合は、30 分間も置かなくても大丈夫 (15 分間ぐらい?)。
- 4) 1) で温めておいたヒートブロックで、42 °C、 40~60 秒間ヒートショック。
- 5) チューブを氷上に戻し約 2 分間静置。
- 6) SOC 培地、あるいは LB 培地を適量加えて優しくピペッティング、溶液の全部あるいは一部をアガープレートに撒く。※アンピシリン耐性の時は、Amp 入りのアガープレートにすぐに大腸菌を撒いても大丈夫。カナマイシン耐性の時は、抗生物質を含まない培地で 37 °C、 1 時間程度プレ培養してからプレートに撒く (ここ大事!)。この違いの理由は抗生物質の作用機序の違いによりますが、詳しくは後で調べてくださいね。
- 7) 大腸菌を撒いたプレートを、寒天側を上にして 37 °C で一晩インキュベート。※12~16 時間後。この時点で全くコロニーが見えなかったらあきらめましょう。ちょっとでも点が見えるなら、もう少しインキュベーターで放置してみる。

Note1:

形質転換の効率は、コンピテントセルを自作したか購入したか、環状プラスミド DNA かライゲーション

産物かなどによって異なる。通常、0.1 pg～20 pg の DNA を用いる。プラスミド DNA で形質転換する時は、1～10 pg ぐらいあれば十分だけれど、ライゲーション産物で形質転換する時は、20～50 ng の DNA（線状化したプラスミド DNA の量）を使っています。

Note2:

とにかく、ヒートショックまでは大腸菌を温めない、雑に扱わないこと。優しく。

Note3:

プラスミドを増やして抽出するのによい大腸菌株、タンパク質を大量発現して単離精製するのによい大腸菌株、などなど沢山の種類があるので適宜使い分ける。

ちなみにプラスミドの調製によく用いられるのは、"JM109"、"DH5α"、"XL1-Blue"など。タンパク質の発現には BL21 系など。

Day2: コロニーのピックアップ (朝&夕方以降)

【準備するもの】

- 抗生物質入りの LB 培地
- スピッツ管

- 1) 大腸菌を撒いたアガープレートをインキュベーターから取り出し（12～16 時間後）、室温あるいは冷蔵庫に置いておく。※夏場の暑い時、コロニーがびっしり生えている時は、室温で放置したら数時間後にはコロニー同士がくっついちゃうかもなので、冷蔵庫保管がベター。あと、コロニーをすぐにピックアップしない時も冷蔵庫で保管。この時、乾かないようにラップでプレートを覆って保管すること。
- 2) 抗生物質入りの LB 培地をスピッツ管に 2～3 ml 分注。
- 3) 1)のコロニーを滅菌した爪楊枝あるいはイエローチップ（200 μl）の先でつつき、2)の培地に植菌する。単一の、他のコロニーから十分離れたコロニーをつくこと。※コロニーがめちゃ小さい時などは爪楊枝が良いかもしれません。表面がザラッとしているので、空振りが少ないかも。でも私はチップが好きです。ピックアップの時は、爪楊枝あるいはチップの先がほんの少しコロニーに触れるぐらいで十分。
- 4) 37 °C で一晩振とう培養する。

Note1:

1 種類のプラスミド DNA（or ライゲーション産物）につき、数個のコロニーをピックアップする。例えば、自分の望みの配列（インサート）をライゲーションしたコンストラクトを作りたい場合、インサートが入っていないものが取れたり、配列中に変異が入ったものが取れたりするので、複数個のクローンをピックアップしておいて、その中で当たりがあれば良しとしましょう。

Day3: プラスミド DNA の抽出（午前中）

【準備するもの】

- プラスミド抽出キット（QIAGEN, Promega, MACHEREY-NAGEL など各社が販売しています）

- 1) 前日から振とう培養した大腸菌の懸濁液（培地が濁っていたら、大腸菌がちゃんと増えている証拠）を 4 °C で 10 分間ぐらい遠心、上清をデカンテーションで捨てる。
- 2) あとはキットのプロトコル通り。

操作を大まかに説明すると...

大腸菌の Buffer（RNase A 入り）への懸濁 → アルカリ溶液（NaOH-SDS）で大腸菌の溶解、DNA の変性（to 1 本鎖）→ 中和（KOAc）☆ここで genomic DNA はタンパク質と一緒に沈殿、SDS もあらかた沈殿、プラスミド DNA は 2 本鎖に戻って可溶性画分へ → カラムに担持させて洗浄操作 → プラスミド DNA の溶出

Note1:

アルカリ溶液を入れた後は、とにかくボルテックス禁止！

Transformation of *E. coli* with plasmid DNA → Extraction of the plasmid

Day 1: *E. coli* Transformation with Plasmid DNA (evening onwards)

Materials:

- Chemical competent cells
- Plasmid DNA or ligation product
- Agar plates with an antibiotic
- SOC medium or LB medium
- ColiRoller™ plating beads or Bacterial spreaders

- 1) Preheat the heat block to 42 °C.
- 2) Retrieve tubes containing competent cells (10 µL to 100 µL) from –80 °C (Deep freezer) and allow them to thaw on ice. *If the volume is around 100 µL, you can briefly thaw them at room temperature before placing them on ice until partially melted.
- 3) Once the competent cells have thawed, add the DNA and incubate on ice for 30 minutes. *For larger volumes of competent cell solution (≥ 50 µL), gently pipette to mix the cells and DNA several times. Conversely, if the volume is 10 µL, mixing is not necessary. For cyclic plasmid DNA transformation, a 15-minute incubation on ice may suffice.
- 4) Perform a heat shock in the preheated heat block at 42 °C for 40–60 seconds.
- 5) Immediately chill the cell on ice and let it sit for approximately 2 minutes.
- 6) Add an appropriate volume of SOC or LB medium, gently pipette, and spread all or part of the cell suspension onto the agar plate. *For Ampicillin resistance, immediately spread *E. coli* onto an ampicillin agar plate. For Kanamycin resistance, preincubate in antibiotic-free medium at 37 °C for 1 hour before spreading onto the plate (critical step!). This arises from differences in antibiotic action mechanisms (please investigate the reason by yourself).
- 7) Incubate the plates with the agar side up at 37 °C overnight. *After 12–16 hours, if no colonies are visible, consider the transformation unsuccessful. If there are even a few and small colonies, continue incubation for a bit longer.

Note1:

Transformation efficiency varies based on whether the competent cells are homemade or purchased and whether the DNA is cyclic plasmid DNA or a ligation product. Typically, 0.1–20 pg of DNA is used. For plasmid DNA transformation, 1–10 pg is sufficient, while for ligation products, 20–50 ng of DNA (amount of linearized plasmid DNA) is recommended.

Note2:

Handle *E. coli* very gently and avoid warming them until the heat shock step.

Note3:

Different strains of *E. coli* serve different purposes, such as amplifying and extracting plasmids or expressing and purifying proteins. Choose the appropriate strain accordingly. Common strains include "JM109," "DH5 α ," and "XL1-Blue" for plasmid preparation and BL21 series for protein expression.

Day 2: Colony picking (morning & evening)**Materials:**

- LB medium with antibiotics
 - Spitz tubes
- 1) Retrieve the agar plates inoculated with *E. coli* from the incubator (after 12 to 16 hours) and place them at room temperature or in a refrigerator. *During hot summer days, when the colonies grow densely, it's advisable to store them in the refrigerator to prevent clustering and sticking together. If colony picking is not immediate, refrigeration is recommended too. Cover the plates with plastic wrap to prevent them from drying out.
 - 2) Dispense 2–3 ml of LB medium with antibiotics into a Spitz tube.
 - 3) Using a sterile toothpick or a yellow pipette tip (200 μ L), pick the colonies from 1) and inoculate them into the medium in 2). Touch a single, well-isolated colony on the plate. *For very small colonies, a toothpick may be preferable as its rough surface reduces the risk of dislodging the colony. However, pipette tips can be also used. When picking a colony, you don't have to get it all off.
 - 4) Incubate overnight at 37°C with shaking.

Note1:

Pick up multiple colonies per plasmid DNA (or ligation product). When attempting to create a DNA construct containing the gene of interest (insert), it's common to encounter clones lacking the insert or containing mutations. By selecting multiple clones, you can increase the chances of obtaining the desired construct.

Day 3: Plasmid DNA Extraction (morning)**Materials:**

- Plasmid extraction kit (available from QIAGEN, Promega, MACHEREY-NAGEL, and other companies)
- 1) Centrifuge the *E. coli* suspension at 4 °C for about 10 minutes, then discard the supernatant by decantation.
 - 2) Follow the protocol provided with the kit. *The procedure is outlined as follows:
E. coli Suspension in Buffer (with RNase A) \rightarrow *E. coli* lysis in alkaline solution (NaOH-SDS), DNA

denaturation (to single strand) → Neutralization (KOAc) *where genomic DNA precipitates along with protein and SDS, while the plasmid DNA returns to be double-stranded and stay in the soluble fraction → Column washing → Elution of the plasmid DNA.

Note1:

Do not vortex after adding the alkaline solution, as it will shear the genomic DNA!